

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 牧口 智夫
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 629 号
学位授与の日付 平成 27 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 プロテオーム解析におけるフケ混入データの自動抽出・除去プログラムの開発

論文審査委員 主査 教授 成田 一衛
副査 教授 山本 格
副査 教授 河内 裕

博士論文の要旨

【背景と目的】プロテオミクス解析により、タンパク質発現に差異のあるタンパク質が探索され、多くの疾患バイオマーカー候補が見出されている。その中で非標識タンパク質量解析法は質量分析 (MS) 装置によるタンパク質同定に使われた未標識 (ラベルフリー) の MS スペクトルからペプチドイオンとフラグメントイオンの強度を利用してタンパク質の相対発現レベルをスペクトル指数 (SIN) として表す方法で、注目されている手法である。

質量分析装置の性能向上により検出感度が高まるにつれ、実験者や実験環境から由来するフケの測定サンプルへのコンタミが問題となっている。

【方法】この問題を解決するため、Microsoft 社のプログラミング言語 VBA : Visual Basic For Application を用い Excel アプリケーション機能をカスタマイズすることにより、MS タンパク質検索エンジン (MASCOT) より出力されたタンパク質同定結果から簡便に注目するタンパク質の SIN を表示させ、サンプル中にフケ (dandruff, D) による汚染があった場合にフケ由来タンパク質の強度 (SIGI) を減算しフケ混入分を除き、サンプル本来の SIN 値を求めた値 SIN(-D) を表示するプログラムの開発を行った。

プログラムの開発にあたっては、Western blotting によりフケに発現しているケラチンの確認を行い、その後、ヒトの腎組織 (皮質) 由来ペプチドサンプルに予め調整したフケペプチドを 5%、10%、20%、30%、50%、60%、80%、100% の割合で添加した後に質量分析し、それらのタンパク質同定結果からフケ特異的ケラチン : KRT1、KRT10 をフケの内部標準物質として、それらの SIGI 回帰分析により、フケの混入率を推測することが可能になった。

【結果】本研究では、ペプチドサンプルの MASCOT 同定結果から調べたいタンパク質の同定情報をスペクトル指数 (SIN) として表示し、フケによるコンタミが判明した場合、フケ成分のタンパク質分を除去するプログラム、SIN(-D) を開発した。

【考察】フケの主な成分は、ケラチンである。ケラチンは、酸性のタイプ I と中性～塩基性のタイプ II が存在し、タイプ I とタイプ II がペアとして結合し、二量体を形成する。さらに個々のケラチノサイトにおいて通常複数のタイプ I とタイプ II のケラチンが発現し、細胞内のケラチン線維は、2 種類以上の異なった二量体 (四量体) が形成される。上皮細胞の種類や分化度により特異的な分子種のペアが形成さる。

顆粒層にはタイプIIのKRT1、KRT2eとタイプIのKRT10が発現し2種類の二量体が形成されるとされている。

本研究においてサンプルへのフケの混入率を推測する内部標準タンパク質としてKRT1とKRT10の二量体ペアを使用した。KRT2eについてKRT10の二量体ペアとしてKRT1と同様に検討したが、KRT1とKRT10の合計SIGIの平均値とフケペプチド混入率の回帰分析多項式寄与率を上回らなかったため、除外した。

フケタンパク質を減算するSIN(-D)は、フケの混入が本来サンプルに含まれているタンパク質の同定結果に影響を与えると予想し、影響分を補正する計算式を構築した。検定による検証結果からフケ混入率80%までは有意差がなかったことから、減少するSIN値を補正することが可能と考えられた。しかし、フケ混入率30%前後から存在するはずのタンパク質が同定されないケースも発生した。フケ混入率が30%を超えるとサンプル中の元サンプルタンパク質量が減少することによりそれらのタンパク質自体が同定されない可能性が考えられた。このことからフケのコンタミが30%を超えると判定される場合は、データの信頼性が低下するため、そのデータを使用しないことが望ましいと考えられた。

本研究でプロテオームデータに含まれる調べたいタンパク質の含有率を正確かつ短時間で表示し、更にフケコンタミ分のタンパク質データを本来のSIN値に還元できるプログラムを作成することが出来た。今後、このプログラムを利用し、プロテオーム解析するサンプルのケラチン汚染状況を把握し、信頼性の高い情報を取得していきたいと考えている。

【結論】 フケの内部標準タンパク質を確定し、フケ由来タンパク質データ減算プログラムを開発した。本研究で開発したプログラムは、各種プロテオーム解析においてコンタミが疑われるデータであってもSIN(-D)を用いてコンタミが無い状態還元できるツールとして、利用が期待できる。

審査結果の要旨

プロテオミクス解析で疾患バイオマーカーを探索する際、非標識タンパク質定量解析法としてスペクトル指数(SIN)が注目されている。一方、質量分析サンプルへの実験者や実験環境から由来する汚染が問題となっている。本研究は汚染があっても、その主成分であるフケ(dandruff, D)プロテオームを解析結果から削除するツールを作成し、その有用性を検証することを目的とした。

Microsoft社のプログラミング言語Visual Basic For Applicationを用いExcel機能をカスタマイズすることにより、質量分析によるタンパク質検索エンジン(Mascot)のタンパク質同定結果から、タンパク質のSINを算出し、サンプル中にフケによる汚染があった場合にフケ由来のプロテオームを除き、サンプル本来のタンパク質量SIN(-D)を算出するプログラムの開発を行った。

Western blotting法によりフケに発現しているケラチンの確認を行い、フケに特異的なケラチン1と10を選定した。その後、ヒトの腎組織(皮質)由来ペプチドサンプルに予め調整したフケペプチドを5%、10%、20%、30%、50%、60%、80%、100%の割合で添加し、質量分析した結果からフケ特異的ケラチンを内部標準物質として、フケの混入率を推測することができた。また、SIN(-D)は、フケ混入率が30%を超えると元サンプルタンパク質量の量が減少するため30%を超えるコンタミが判明した場合は、そのデータを使用しないことが望ましいと考えられた。

以上、本研究は表計算ソフトExcelで質量分析計によるプロテオーム解析した結果から汚染したフケのプロテオームを除去できるツールを作成し、その有用性を示した点に学位論文としての価値を認める。